

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Dezember 2001 (13.12.2001)

PCT

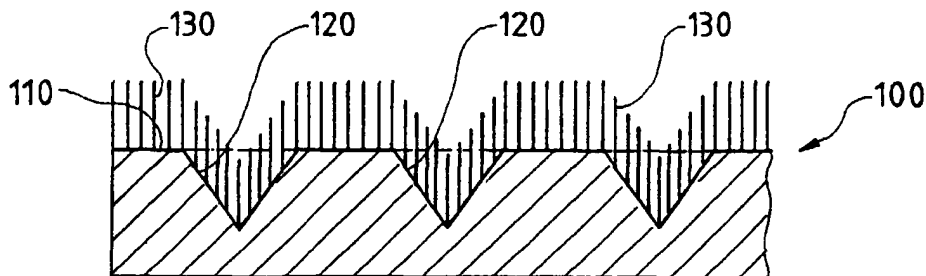
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/94032 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: B05D 3/06, C08F 291/18, G01N 33/543 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PLÜSTER, Wilhelm [DE/DE]; Lenzenrey 6b, 22397 Hamburg (DE). KÖHN, Heinz-Gerhard [DE/DE]; Poppenbütteler Weg 49a, 22339 Hamburg (DE). ULBRICHT, Mathias [DE/DE]; Landsberger Allee 89, 10407 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05173
- (22) Internationales Anmeldedatum: 8. Mai 2001 (08.05.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: EMMEL, Thomas; Schaefer & Emmel, Gehölzweg 20, 22043 Hamburg (DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (30) Angaben zur Priorität: 100 28 851.0 2. Juni 2000 (02.06.2000) DE (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPPENDORF AG [DE/DE]; Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg (DE). Veröffentlicht: — mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SURFACE-FUNCTIONALIZED SUPPORTS USED AS STARTING PRODUCTS FOR MICROARRAYS, FOR IMMOBILIZING BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ALS AUSGANGSPRODUKTE FÜR MIKROARRAYS DIENENDEN OBERFLÄCHFUNKTIONALISIERTEN TRÄGERN ZUR IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing surface functionalized supports used as starting products for microarrays, for immobilizing biomolecules. The support surface is coated with an initiator and the coated surface is then contacted with a solution containing at least one first group of polymerizable monomers, said monomers having binding sites to which the biomolecules (probe molecules) can bind. The conditions under which the monomer solution is contacted with the activated support are chosen in such a manner that the monomers, by mediation of the initiator, bind to the support and, starting therefrom, are polymerized to functional polymer chains, thereby establishing a structure of adjacent functional polymer chains that are fixated on the surface of the support.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung von als Ausgangsprodukt für die Herstellung von Mikroarrays dienenden oberflächenfunktionalisierten Trägern für die Immobilisierung von Biomolekülen, bei dem die Trägeroberfläche mit einem Initiator beschichtet und die beschichtete Oberfläche dann in Kontakt mit einer mindestens eine erste Gruppe von polymerisierbaren Monomeren enthaltenden Lösung gebracht wird, wobei die Monomere Bindungsstellen enthalten, an die Biomoleküle (Sondenmoleküle) binden können und die Bedingungen, unter denen die Monomer-Lösung in Kontakt mit dem aktivierten Träger gebracht wird, so gewählt sind, daß die Monomere unter Vermittlung durch den Initiator an den Träger binden und davon ausgehend zu funktionellen Polymerketten polymerisieren dergestalt, daß eine an der Oberfläche des Trägers fixierte Struktur von benachbarten funktionellen Polymerketten entsteht.

WO 01/94032 A1



— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Herstellung von als Ausgangsprodukte für Mikroarrays dienenden oberflächenfunktionalisierten Trägern zur Immobilisierung von Biomolekülen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Trägern zur Immobilisierung von Biomolekülen, die zur Herstellung von Mikroarrays verwendet werden sollen, auf ein Verfahren zur Herstellung solcher Mikroarrays ausgehend von den erfindungsgemäß hergestellten oberflächenfunktionalisierten Trägern sowie auf die mit den Verfahren herstellbaren Träger und Mikroarrays.

Unter Mikroarrays sollen im folgenden flächige Träger (Slides) verstanden werden, auf deren Oberfläche in definierten voneinander isolierten Bereichen (Spots) als Sonden (Sondenmoleküle) dienende Biomoleküle gekoppelt sind, die ihrerseits eine spezifische Bindung mit weiteren zu analysierenden Biomolekülen (Target-Molekülen) eingehen können. Diese Spots werden als zweidimensionale Objekte detektiert. Der Begriff Array ist weit zu fassen und schließt soweit er hier gebraucht wird auch andere Verteilungen von Spots auf der Trägersoberfläche ein, die nicht zwingend unter eine Arrayanordnung im strengen Sinne fallen.

Mit dem Begriff Träger werden im folgenden die nicht behandelten Glas- oder Kunststoffslides bezeichnet. Nach Funktionalisierung werden die Träger als funktionalisierte Träger bezeichnet, wobei hier noch keine Sondenmoleküle gekoppelt sind. Der Begriff Mikroarrays wird nur für funktionalisierte Träger verwendet, an denen Sondenmoleküle gekoppelt sind.

Mikroarrays werden insbesondere z.B. zur Analyse komplexer DNA- oder RNA-haltiger Gemische oder zur Proteinanalyse eingesetzt. Die mit Microarrays arbeitende Technik soll im folgenden auch als Array-Technik bezeichnet werden.

Als Sondenmoleküle für DNA- oder RNA-Analysen werden z.B. Oligonukleotide eingesetzt. Bei Proteinanalysen können Antigene oder Antikörper als Sondenmoleküle an die Träger gekoppelt werden. Insbesondere soll sich die Erfindung auf Verfahren zur Herstellung von Mikrochips für die Nukleinsäureanalyse beziehen.

Die Sondenmoleküle können z.B. direkt auf die Oberfläche der Träger synthetisiert werden. Bevorzugt werden die Sondenmoleküle jedoch mittels einer als Spotting bezeichneten Technik auf die Trägersoberfläche abgesetzt, die dann so funktionalisiert sein muß, daß sie die Sondenmoleküle koppelt.

Zum Spotten, d.h. Absetzen von Tropfen mit gelösten Sondenmolekülen auf der Trägersoberfläche, werden z.B. Pin-Köpfe oder InkJet-Print-Verfahren eingesetzt, die automatisiert Sondenmoleküle enthaltende Spots bevorzugt in Arrayanordnung auf dem Träger erzeugen. In herkömmlichen Spotting-Verfahren betragen die Tropfengrößen üblicherweise zwischen 0,03 bis 2 nl. Diese Tropfen besitzen damit dreidimensionalen Charakter.

Die Immobilisierung der Sondenmoleküle mittels Spotting setzt eine entsprechende Funktionalisierung der Trägeroberfläche voraus. Bekannt ist in diesem Zusammenhang eine Beschichtung des Trägers mit Polylysin oder eine Silanisierung der Träger. Beide Verfahren haben Nachteile. So führt die Polylysin-Beschichtung zu unspezifischen Bindungen und einem ungewollten Verlaufen der Tropfen nach dem Spotten. Bei der Silanisierung von Glas-Slides kann es auch zu unspezifischen Signalen kommen, die die Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Das US-Patent 5,858,653 beschreibt Träger für die Array-Technik, die an ihre Oberfläche gekoppelte hydrophile Polymere aufweisen, welche reaktive Gruppen enthalten, die unter Thermoaktivierung mit z.B. Oligonukleotiden eine kovalente Bindung eingehen können. Die Herstellung der Träger erfolgt durch Ankoppeln der zuvor synthetisierten Polymere an die Trägeroberfläche, ggf. unter Nutzung photoreaktiver Gruppen im Polymer. Nachteilig ist, daß sich die relativ großen Polymere nur mit geringer Belegungsdichte und in relativ ungleichmäßiger Verteilung an den Träger koppeln lassen.

Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Trägern und Mikroarrays für die Array-Technik zu schaffen, die die Nachteile des Standes der Technik überwinden.

Gelöst wird die Aufgabe mit Verfahren gemäß der Ansprüche 1 und 16.

Das erfindungsgemäße Verfahren gemäß Anspruch 1 betrifft die Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Trägern, die dann gemäß Anspruch 16 zu Mikroarrays, insbesondere Mikrochips für die Nukleinsäureanalyse weitergebildet werden können.

Erfindungsgemäß ist nach Anspruch 1 zunächst vorgesehen, daß die Oberfläche eines Trägers zunächst mit einem Initiator beschichtet wird, wobei der Initiator an der Oberfläche des Trägers z.B. adsorbiert ggf. auch kovalent gebunden wird.

Dann wird die mit dem Initiator beschichtete Oberfläche in Kontakt mit einer mindestens eine erste Gruppe von polymerisierbaren Monomeren enthaltenden Lösung gebracht. Die Bedingungen unter denen die Monomere mit der aktivierten Trägeroberfläche in Kontakt gebracht werden sowie der zur Aktivierung eingesetzte Initiator sind so gewählt, daß die Monomere unter Vermittlung durch den Initiator an die Trägeroberfläche binden und davon ausgehend zu funktionellen Polymerketten polymerisieren.

Erfindungsgemäß ist weiterhin vorgesehen, daß die eingesetzten Monomere der ersten Gruppe Bindungsstellen enthalten, an die die als Sondenmoleküle eingesetzten Biomoleküle binden können, ggf. unter Ausbildung einer kovalenten Bindung.

Aus der WO 00/12575 sind polymere Festphasenträger bekannt, die nach einem ähnlichen Verfahren hergestellt werden und die insbesondere den speziellen Anforderungen der Spotting-Technologie genügen. Allerdings ist in der WO 00/12575 nicht angegeben, daß die dort beschriebenen funktionalisierten Träger zu Microarrays, insbesondere Mikrochips für die Nukleinsäureanalyse weiterverarbeitet werden können. Die in der WO 00/12575 beschriebenen Verwendungszwecke beschränken sich im wesentlichen auf die Herstellung von chemischen Substanzbibliotheken.

In einer erfindungsgemäßen Ausgestaltung kann vorgesehen sein, daß mindestens eine weitere zweite Gruppe von Monomeren mit der ersten Gruppe an den Träger copolymerisiert wird. Die Monomere der zweiten Gruppe tragen im wesentlichen

keine Bindungsstellen für Biomoleküle und dienen z.B. zur Verteilung und Steuerung der Belegungsdichte des Trägers mit Bindungsstellen und zur Einstellung der Hydrophobie oder Hydrophilie der funktionellen Polymerketten.

Es kann weiterhin eine dritte Gruppe von Monomeren eingesetzt werden, die nicht kovalente Bindungsstellen aufweisen, die in der Lage sind, Sondenmoleküle zu den kovalenten Bindungsstellen zu dirigieren. Geeignet sind z.B. Monomere mit kationischen Gruppen wie z.B. die besonders für Nukleinsäuren geeignete Gruppe NR_4^+ oder anionische bzw. chelatisierende Gruppen, die für Proteine geeignet sind.

Die Ausbildung der funktionellen Polymere kann entweder durch Polymerisation der Monomere der ersten Gruppe oder durch Copolymerisation der Monomere der ersten und zweiten, der ersten und dritten oder der ersten, zweiten und dritten Gruppe erfolgen.

Die Erfindung bietet eine ganze Reihe von Vorteilen. Ein wesentlicher Vorteil ist, daß die die Bindungsstellen tragenden funktionellen Polymerketten ausgehend von der Trägeroberfläche in situ gebildet werden. Die Trägeroberfläche reagiert also zunächst mit Monomeren, die aufgrund ihrer geringen Größe mit gut steuerbarer und auch falls gewünscht relativ hoher Dichte auf der Trägeroberfläche gekoppelt werden können. Die Trägeroberfläche kann also erfindungsgemäß deutlich dichter mit den in situ gebildeten funktionellen Polymerketten belegt werden, als dies bei der bekannten Kopplung von zuvor synthetisierten Polymeren an die Trägeroberfläche möglich ist.

Weiterhin ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren in besonders effektiver Weise eine dreidimensionale Verteilung der Bindungsstellen über der Trägeroberfläche. Dies führt zu einer erhöhten Bindungskapazität pro Fläche für Son-

denmoleküle und zu einer Verringerung von unspezifischen Bindungen, woraus ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis resultiert.

Ein weiterer Vorteil ist, daß die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in gut steuerbarer Dichte nebeneinander angeordneten funktionellen Polymerketten ein schnelles Verdampfen und ein Verlaufen von Flüssigkeit verhindern, was zu einer besseren Ausbeute bei der Bindung von Sondenmolekülen in einem Spot, einer verbesserten Gleichmäßigkeit über die Spotfläche und zu einer Verringerung von Kreuzkontaminationen zwischen benachbarten Spots führt. Durch die einstellbare dreidimensionale Struktur der funktionellen Polymerketten wird eine Stabilisierung der beim Spotten abgesetzten Tropfen gewährleistet. Die abgesetzten Tropfen behalten im Gegensatz zum Stand der Technik beim Absetzen auf die erfindungsgemäß hergestellten Träger im wesentlichen ihre dreidimensionale Struktur, was zu besser definierten Spots führt.

Als Träger können erfindungsgemäß Glas- oder Kunststoffträger (Slides) eingesetzt werden. Die Kunststoffträger können z.B. aus Polystyrol, Polycarbonat, Polyvinylchlorid oder auch Polypropylen bestehen, um nur einige Beispiele zu nennen.

Die Träger besitzen in aller Regel eine flächige Form. In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung kann vorgesehen sein, daß in dem für die Funktionalisierung vorgesehenen Oberflächenbereich des Trägers Vertiefungen ausgebildet sind. Auf diese Weise kann in einfacher Weise eine Vergrößerung der funktionalisierbaren bzw. beladbaren Trägeroberfläche erreicht werden.

Die Vertiefungen können unterschiedliche Formen aufweisen, z.B. in Form von Rillen oder beliebigen Einprägungen und regelmäßig oder unregelmäßig in der Trägeroberfläche verteilt sein. Bevorzugt ist vorgesehen, daß Form und Größe

der Vertiefungen übereinstimmen und daß weiterhin die Vertiefungen mit übereinstimmenden Abständen zueinander in der Trägeroberfläche ausgebildet sind. Es ergibt sich dann ein regelmäßiges Muster, das in vorteilhafter Weise reproduzierbar von den üblicherweise eingesetzten, ein Muster abfahrenden Spotting-Einrichtungen beladen werden kann.

Besonders bevorzugt werden die Vertiefungen in Form einer mit ihrer Spitze in den Träger weisenden Pyramide oder Kegel ausgebildet. Insbesondere bei Vertiefungen mit dieser Form erhält man in optimaler Weise eine Vergrößerung der Trägeroberfläche. Es kann davon ausgegangen werden, daß eine kegelförmige Vertiefung eine um einen Faktor 2 bis 3 größere Oberfläche aufweist, als die Kegelgrundfläche (also eine vergleichbare Fläche bei einem planaren Träger), was im Endeffekt heißt, daß man den Träger mit höherer Dichte funktionalisieren und dementsprechend mit mehr Sondenmolekülen beladen kann.

In Abhängigkeit von der gewählten Art der Beschichtung mit Initiatoren kann es erforderlich sein, daß die Träger in einem Vorschrift noch zusätzlich behandelt werden, um z.B. überhaupt eine Kopplung des Initiators an ihrer Oberfläche zu ermöglichen. Eine gängige Methode für Träger aus Glas ist z.B. die Silanisierung. Auch dies gehört zum Stand der Technik. Es wird darum an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen. Bei Trägern aus Kunststoff ist in aller Regel eine solche Behandlung in einem Vorschrift nicht erforderlich.

Als Initiatoren eignen sich z.B. thermisch-, photochemisch- oder redox-aktivierbare Verbindungen wie z.B. Benzoinderivate, Azoverbindungen oder Peroxide. Ein besonders geeigneter Initiator ist z.B. Benzophenon. Bei Benzophenon handelt es sich um einen mittels UV-Licht aktivierbaren Initiator. Zur Beschichtung des Trägers mit Benzophenon reicht es aus, daß der Träger für eine bestimmte Dauer in eine benzophenonhaltige Lösung getaucht wird.

In einem nächsten Schritt wird der z.B. mit Benzophenon beschichtete Träger mit den Monomeren equilibriert. Dann erfolgt im Falle der Benzophenon-Aktivierung eine Bestrahlung mit UV-Licht, wobei das Benzophenon eine Bindung der Monomere an die Trägeroberfläche vermittelt.

Die beschriebene In-Situ-Technik unter Vermittlung eines UV-induzierbaren Initiators wird als Photo-Initiierte-Pfropf-Polymerisation bezeichnet und ist z.B. in der Veröffentlichung von "Ulbricht et al." in "Colloids and Surfaces Vol 138, 1998, S. 353 beschrieben. Die dort beschriebenen mittels Propf-Polymerisation herstellbaren Substrate sollen insbesondere zu Ultrafiltrationszwecken eingesetzt werden. Ein Einsatz in der Array-Technik sowie die gezielte Herstellung für diese Technik ist der Veröffentlichung nicht entnehmbar.

Denkbar sind selbstverständlich auch andere Initiatoren, die aufgrund ihrer speziellen Konfiguration oder Reaktivität eine Bindung zwischen der Trägeroberfläche und dem Monomer vermitteln können. Denkbar ist dabei, daß der Initiator auch in das gebildete Molekül eingebaut wird oder aber auch wie z.B. im Falle des Benzophenon, daß der Initiator nur die Bindung vermittelt und nicht selbst eingebaut wird.

Als Monomere eignen sich alle Verbindungen, die gut polymerisierbar sind wie z.B. Acrylsäure, Methacrylsäure, Derivate der Acrylsäure oder Methacrylsäure und Vinyl- und Allylverbindungen.

Besonders geeignete Monomere der ersten Gruppe, die zusätzlich Bindungsstellen aufweisen, die in der Lage sind, die gewünschten Sondenmoleküle ggf. kovalent zu binden, sind z.B. Acrylsäure, Glycidylmethacrylat oder Aminoalkylmethacrylat.

Als Monomere der zweiten Gruppe eignen sich alle Verbindungen, die Eigenschaften besitzen, um die Hydrophilie oder Hydrophobie der funktionellen Polymerketten einzustellen. Besonders geeignet sind z.B. Polyäthylenglykol, Methacrylate oder Hydroxymethylmethacrylamid.

Die Bindungsstellen sind in der Regel funktionelle Gruppen, die in den Monomeren enthalten sind. Insbesondere sind solche Bindungsstellen COOH-, SH-, NH₂-, Epoxid-, oder Thiolgruppen, die eine kovalente Bindung des Sondenmoleküls ermöglichen. Die Auswahl der Monomere bzw. der als Bindungsstellen dienenden funktionellen Gruppen kann in einfacher Weise an die zu bindenden Sondenmoleküle angepaßt erfolgen. Für den Fachmann stellt dies kein Problem dar.

Die erfindungsgemäß oberflächenfunktionalisierten Träger sollen hauptsächlich nach Kopplung mit Sondenmolekülen in definierten Spots als Mikroarrays Anwendung finden. Die Array-Technik ist insbesondere in Verbindung mit Nukleinsäure-Analysen eine gängige Methode. Es soll darum an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen werden.

Wesentliches Merkmal dieser Technik ist, daß Mikroarrays eingesetzt werden, an denen in definierten Orten Sondenmoleküle gekoppelt sind, die hochspezifische Bindungseigenschaften für z.B. Nukleinsäuremoleküle mit bestimmten Basensequenzen oder Proteine mit bestimmten immunologischen Eigenschaften haben.

Die Belegung der definierten Orte mit solchen Sondenmolekülen erfolgt in der Regel wie erwähnt automatisiert mittels einer als Spotting bezeichneten Technik. Spotting ist eine bekannte Technik, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

Die erfindungsgemäß hergestellten oberflächenfunktionalisierten Träger können nun z.B. mittels Spotting-Techniken mit Sondenmolekülen belegt werden, und auf diese Weise zu Mikroarrays weiterverarbeitet werden.

Es lassen sich dabei z.B. Plasmid-DNA, Cosmid-DNA, Bakteriophagen-DNA, genomische DNA, RNA, cDNA, pDNA und Oligo-Nukleotide koppeln, um nur einige Beispiele zu geben. Denkbar ist selbstverständlich auch, daß an die genannten Bindungsstellen Antigene bzw. Antikörper zur Proteinanalyse gekoppelt werden oder andere Biomoleküle.

Die Erfindung ist nicht nur auf Verfahren zur Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Trägern oder Mikroarrays beschränkt. Sie deckt vielmehr auch nach diesem Verfahren herstellbare funktionalisierte Träger und Arrays ab.

Insbesondere soll die Erfindung Verfahren zur Herstellung von oberflächenfunktionalisierten Trägern abdecken, die zu Mikro-Chips für Nukleinsäureanalyse weiterverarbeitet werden können und entsprechende Mikrochips.

Im folgenden soll die Erfindung anhand eines Beispieles und dreier Figuren näher erläutert werden.

Figur 1

dokumentiert das Bindungsverhalten eines Ausführungsbeispiels des erfindungsgemäß herstellbaren funktionalisierten Trägers,

Figur 2

zeigt eine Ausführung eines erfindungsgemäß einsetzbaren Trägers in Aufsicht,

Figur 3 zeigt einen ausgehend von dem Träger aus Figur 2 hergestellten oberflächenfunktionalisierten Träger im Schnitt.

Beispiel:**Herstellung von funktionalisierten Glaträgern**

Es wurden einseitig silanisierte Glaträger (CCT, Jena) eingesetzt. Die Glaträger wurden für 15 min. in eine 100 mM Lösung von Benzophenon in Aceton eingetaucht, dann mit einer mM-Lösung von Benzophenon in Aceton gespült und anschließend an der Luft getrocknet. Danach wurden die Glaträger mit der silanierten und der mit Benzophenon beschichteten Seite auf die unten angegebenen Monomerlösungen unter Zusatz von 1 mM Natriumperiodat ohne Einschluß von Luftblasen zwischen Glas und Lösung aufgebracht. Nach 15 min. Equilibrierzeit wurden die auf der Monomerlösung schwimmenden Proben durch das Glas hindurch belichtet (t_{UV}). Nach weiteren 15 min. Nachreaktionszeit wurden die Träger extensiv mit Wasser, dann mit Aceton und anschließend wieder mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Proben getrocknet.

A) Als Monomer-Lösung wurde Acrylsäure in einer Konzentration 25g/l Wasser verwendet. Diese Monomer-Lösung wurde bei unterschiedlichen Belichtungszeiten (t_{UV}) behandelt.

Die durch diese Monomere bereitgestellten Bindungsstellen waren Carboxylgruppen.

Die unterschiedlichen Varianten sind im folgenden zusammengefaßt:

12

- | | | |
|----|------------------|------------------|
| 1. | Acrylsäure 25g/l | 7,5 min t_{UV} |
| 2. | Acrylsäure 25g/l | 10 min t_{UV} |
| 3. | Acrylsäure 25g/l | 15 min t_{UV} |

B) Als Monomer-Lösung wurde Glycidylmethacrylat in einer Konzentration von 10g/l Wasser und 20 g/l Wasser mit jeweils 25g/l Wasser Hydroxymethylmethacrylamid eingesetzt. Auch hier wurden unterschiedliche Belichtungszeiten von 10 min (10 bzw. 20 g/l Wasser) bzw. 15 min t_{UV} (nur bei 20 g/l Wasser) eingesetzt.

Die durch diese Monomere bereitgestellten Bindungsstellen waren Epoxid-Gruppen.

Die unterschiedlichen Varianten sind im folgenden zusammengefaßt:

- | | | |
|----|---------------------------|-----------------|
| 1. | Glycidylmethacrylat 10g/l | 10 min t_{UV} |
| 2. | Glycidylmethacrylat 20g/l | 10 min t_{UV} |
| 3. | Glycidylmethacrylat 20g/l | 15 min t_{UV} |
- + jeweils 25g/l Hydroxymethylmethacrylamid

Zur Probe wurden eine Biomolekül-Immobilisierung und -Assay durchgeführt.

A) Biotin wurde via N-Aminoethylbiotinamid ("Biotinamin"; Molecular Probes) an die mit EDC/NHS für 1h bei 25C° aktivierten Oberflächen gekoppelt (Reaktion bei pH= 7,4 für 5 h bei 25C°); Blank-Probe wurden analog, aber ohne "Biotinamin" präpariert.

B) Biotin wurde via "Biotinamin" an die Oberflächen gekoppelt (Reaktion bei pH= 9,6 über Nacht bei 25 C°). Blank-Proben wurden durch Inkubation in Puffer bei pH= 9,6 über Nacht bei 25C° erhalten.

Der Biotin-Assay wurde für A und B mit jeweils 16 mm² funktionalisiertem Glas durchgeführt: 1. Inkubation mit einem Streptavidin-Alkalischen Phosphatase-Konjugat für 30 min bei Raumtemperatur (RT); 2. Reaktion mit Paranitrophenylphosphat (PNP) für 30 min bei 37C° und photometrische Messung des Umsatzes bei 405 nm.

Die Ergebnisse der photometrischen Messung zeigt die Fig. 1.

Man erkennt für beide Fälle eine sehr effiziente Bindung von Biotin an die funktionalisierten Träger. Das Hintergrundsignal (hier durch unspezifische Bindung des Streptavidin-Konjugates) kann dabei durch entsprechende Auswahl der Monomere (B) bzw. über die Steuerung der Belegungsdichte (A 2 und 3) minimiert werden.

Figur 2 zeigt einen flächigen Träger 10 mit einem zur Funktionalisierung vorgesehenen Oberflächenbereich 11, in dem in regelmäßigen Abständen kegelförmige Vertiefungen 12 vorgesehen sind. Die kegelförmigen Vertiefungen können z.B. einen Durchmesser von ca. 20 µm haben und weisen zueinander einen Abstand von ebenfalls 20 µm auf. Übliche Spots haben einen Durchmesser von ca. 100 bis 150 µm und decken damit zwischen 20 bis 40 kegelförmige Vertiefungen auf der Oberfläche 11 des Trägers 10 ab. Diese Angaben sind natürlich nicht zwingend. Es ist genauso gut möglich, Träger einzusetzen, in deren Oberfläche Vertiefungen mit anderer Form, Durchmesser etc. ausgebildet sind. Wesentlich ist jedoch, daß die Vertiefungen sich möglichst in den Träger hinein verjüngen, da die da-

durch entstehenden Schrägflächen die gewünschte Oberflächenvergrößerung bewirken.

Der in Figur 2 dargestellte Träger 10 ist noch nicht oberflächenfunktionalisiert. Den oberflächenfunktionalisierten Zustand zeigt Figur 3 in einer Schnittdarstellung. Man erkennt wiederum einen Träger 100 mit funktionalisierter Oberfläche 110, in der Vertiefungen 120 ausgebildet sind. Die im Rahmen der Funktionalisierung kovalent an die Oberfläche 110 gekoppelten Polymerketten sind mit 130 bezeichnet. Es wird deutlich, daß pro kegelförmige Vertiefung 120 mehr Polymerketten 130 gekoppelt werden können, als dies auf einem vergleichbaren planaren Abschnitt der Oberfläche 110 möglich wäre, die großenteils der Kegelgrundfläche entspricht.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung von als Ausgangsprodukte für die Herstellung von Mikroarrays dienenden oberflächenfunktionalisierten Trägern für die Immobilisierung von Biomolekülen, bei dem die Oberfläche eines Trägers mit einem Initiator beschichtet und die beschichtete Oberfläche dann in Kontakt mit einer mindestens eine erste Gruppe von polymerisierbaren Monomeren enthaltenden Lösung gebracht wird, wobei die Monomere Bindungsstellen enthalten, an die Biomoleküle (Sondenmoleküle) binden können und die Bedingungen, unter denen die Monomer-Lösung in Kontakt mit dem aktivierten Träger gebracht wird, so gewählt sind, daß die Monomere unter Vermittlung durch den Initiator an den Träger binden und davon ausgehend zu funktionellen Polymerketten polymerisieren dergestalt, daß eine an der Oberfläche des Trägers fixierte Struktur von benachbarten funktionellen Polymerketten entsteht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Initiator lichtaktivierbare Substanzen, insbesondere Benzophenon, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Träger aus Glas oder Kunststoff bestehen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die eingesetzten Kunststoffträger aus Polystyrol, Polycarbonat, Polyvinylchlorid, oder Polypropylen bestehen.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Träger flächig ausgebildet sind und in einem für die Funktionalisierung vorgesehenen Oberflächenbereich Vertiefungen aufweisen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß bezüglich Form und Größe übereinstimmende Vertiefungen mit übereinstimmenden Abständen zueinander in der Trägersoberfläche vorgesehen sind.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Vertiefungen die Form einer mit ihrer Spitze in den Träger weisenden Pyramide oder eines Kegels aufweisen.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 4 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß die im Verfahren eingesetzten Träger aus Glas in einem ersten Schritt silanisiert werden.

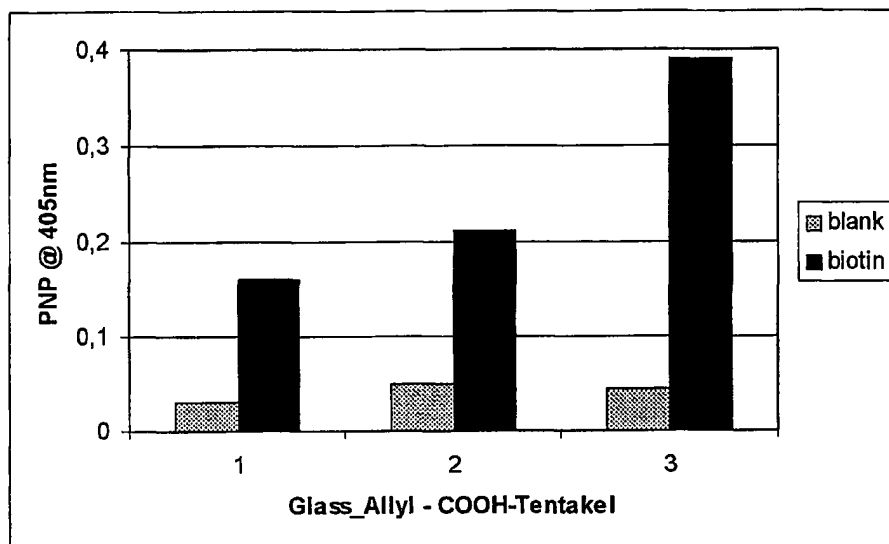
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß mindestens eine weitere zweite Gruppe von Monomeren mit der ersten Gruppe an den Träger copolymerisiert wird, wobei die Monomere der zweiten Gruppe im wesentlichen keine Bindungsstellen für Biomoleküle aufweisen.
10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Auswahl der Monomere der zweiten Gruppe und die Bestimmung der einzusetzen- den Monomerkonzentration gezielt zur Einstellung einer gewünschten Hy- drophilie bzw. Hydrophobie der copolymerisierten funktionellen Polymer- ketten erfolgt.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Auswahl und eingesetzte Konzentration der Monomere der zweiten Gruppe zu co- polymerisierten funktionellen Polymerketten führt, die einen beim Spotten abgesetzten Tropfen in seiner dreidimensionalen Struktur aufnehmen und halten.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Monomere der ersten und zweiten Gruppe aus folgenden Verbin- dungen ausgewählt sind: Acrylsäuren, Methacrylsäuren, Derivate der Acrylsäure oder Methacrylsäure, und Vinyl- oder Allylverbindungen.
13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Monome- re der ersten Gruppe aus folgenden Verbindungen ausgewählt sind: Acryl- säuren, Glycidylmethacrylate oder Aminoalkylmethacrylate.

14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Monomere der zweiten Gruppe aus folgenden Verbindungen ausgewählt sind: Polyäthylenglykole, Methacrylate oder Hydroxymethylmethacrylamide.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß die in den Monomeren der ersten Gruppe enthaltenen Bindungsstellen funktionelle Gruppen sind, insbesondere COOH-, SH-, NH₂-, Epoxid-, oder Thiolgruppen.
16. Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays, bei dem in definierten Bereichen auf einem gemäß der Ansprüche 1 bis 15 hergestellten oberflächenmodifizierte Träger in Lösungsmittel gelöste Sondenmoleküle tropfenweise abgesetzt werden.
17. Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays nach Anspruch 16, bei dem die oberflächenmodifizierten Träger mittels Spotting mit den Sondenmolekülen belegt werden.
18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Sondenmoleküle Oligonukleotide oder Antikörper eingesetzt werden.
19. Verfahren zur Herstellung von Mikroarrays nach einem der Ansprüche 16 bis 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Mikroarrays als Mikrochips für die Nukleinsäureanalyse ausgebildet werden.
20. Oberflächenmodifizierter Träger herstellbar gemäß der Ansprüche 1 bis 15.

21. Träger für die Array-Bindungstechnik herstellbar gemäß der Ansprüche 16 bis 19.

1/2

A



B

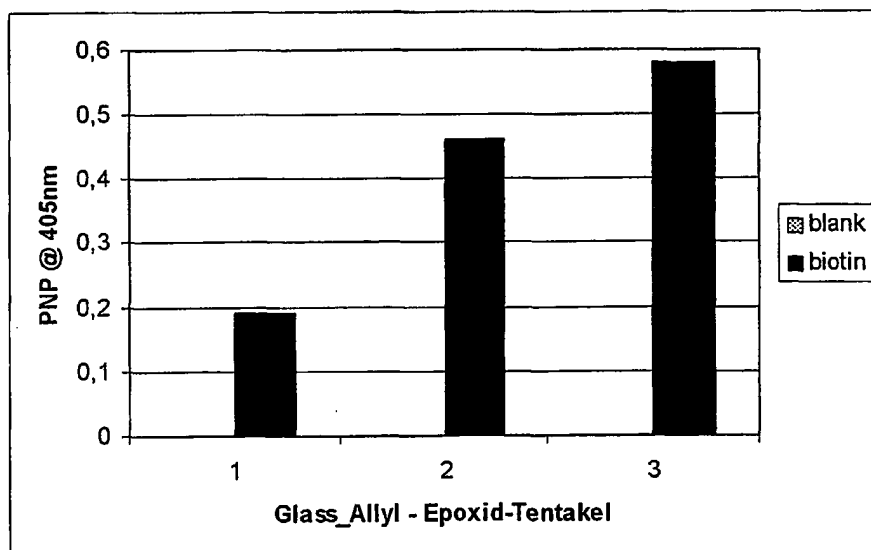


Fig 1

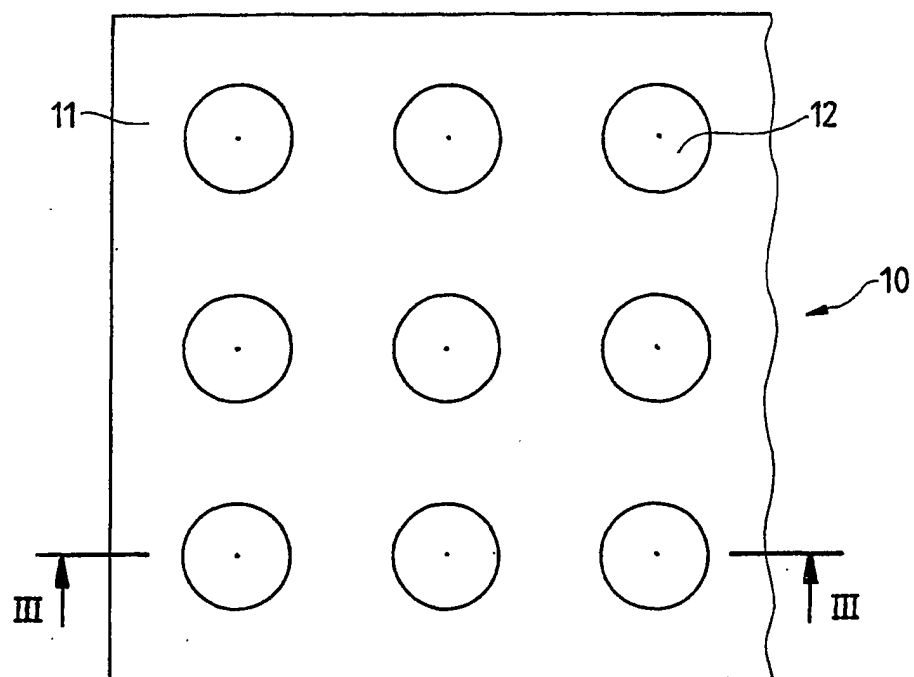


Fig. 2

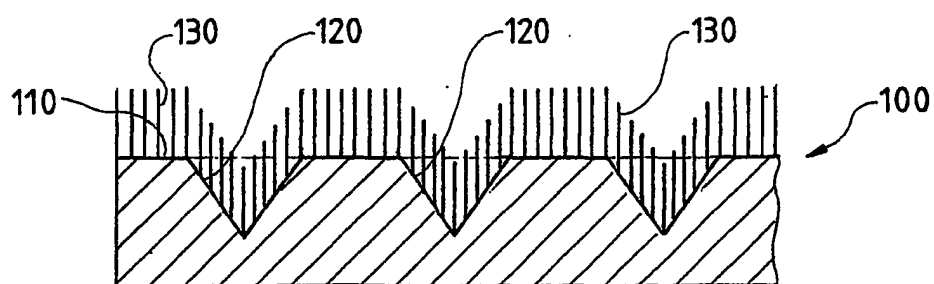


Fig. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In **onal Application No**
PCT/EP 01/05173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B05D3/06 C08F291/18 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 B05D C08F G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 12575 A (JERINI BIO TOOLS GMBH ;VOLKMER ENGERT RUDOLF (DE); WENSCHUH HOLGER) 9 March 2000 (2000-03-09) cited in the application page 3, line 40 -page 4, line 20 page 8, line 6 - line 27 page 9, line 19 - line 23; claims 1-6; figure 1; examples 1,10,14	1-4,9-21
X	SCHULZ M ET AL: "FUNKTIONALISIERTE POLYMERBERFLAECHE" CLB. CHEMIE IN LABOR UND BIOTECHNIK, VERLAG BREIDENSTEIN, FRANKFURT AM MAIN, DE, vol. 51, no. 3, 2000, pages 84-86, XP001015413 ISSN: 0943-6677 the whole document	1-4, 9-13, 15-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2001

Date of mailing of the international search report

15/10/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Veefkind, V

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/EP 01/05173

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>REHMAN F ET AL: "Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 27, no. 2, 15 February 1999 (1999-02-15), pages 649-655, XP002155808 ISSN: 0305-1048 page 650, column 2, paragraph 2 - paragraph 3</p>	1,5-12, 15,20,21
A	<p>WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28 August 1997 (1997-08-28) claim 1; figures 32-34; examples 10-13</p>	1-21
A	<p>WO 99 63385 A (UNIV TEXAS) 9 December 1999 (1999-12-09) page 14, line 6 - line 14; claims 1,9,10,12</p>	5-7
P,X	<p>WO 01 21326 A (CHUDZIK STEPHEN J ;STUCKE SEAN M (US); SURMODICS INC (US); SWAN DA) 29 March 2001 (2001-03-29) abstract page 23, line 7 - line 25; claims 1-33; examples 4,5</p>	1-4, 8-12,15, 20,21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/EP 01/05173

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0012575 A	09-03-2000	AU 5855699 A WO 0012575 A1 EP 1027379 A1	21-03-2000 09-03-2000 16-08-2000
WO 9731256 A	28-08-1997	AU 735440 B2 AU 2799797 A CA 2244891 A1 EP 0920440 A2 WO 9731256 A2	05-07-2001 10-09-1997 28-08-1997 09-06-1999 28-08-1997
WO 9963385 A	09-12-1999	AU 4333799 A WO 9963385 A1 US 6295153 B1 US 2001010843 A1	20-12-1999 09-12-1999 25-09-2001 02-08-2001
WO 0121326 A	29-03-2001	WO 0121326 A1 AU 6249999 A EP 1131167 A1	29-03-2001 24-04-2001 12-09-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ nationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/05173

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B05D3/06 C08F291/18 G01N33/543

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B05D C08F G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 12575 A (JERINI BIO TOOLS GMBH ;VOLKMER ENGERT RUDOLF (DE); WENSCHUH HOLGER) 9. März 2000 (2000-03-09) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 40 -Seite 4, Zeile 20 Seite 8, Zeile 6 - Zeile 27 Seite 9, Zeile 19 - Zeile 23; Ansprüche 1-6; Abbildung 1; Beispiele 1,10,14	1-4,9-21
X	SCHULZ M ET AL: "FUNKTIONALISIERTE POLYMERBERFLÄCHEN" CLB. CHEMIE IN LABOR UND BIOTECHNIK, VERLAG BREIDENSTEIN, FRANKFURT AM MAIN, DE, Bd. 51, Nr. 3, 2000, Seiten 84-86, XP001015413 ISSN: 0943-6677 das ganze Dokument	1-4, 9-13, 15-21

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Oktober 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/10/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Veeffkind, V

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/05173

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	REHMAN F ET AL: "Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 27, Nr. 2, 15. Februar 1999 (1999-02-15), Seiten 649-655, XP002155808 ISSN: 0305-1048 Seite 650, Spalte 2, Absatz 2 - Absatz 3 ---	1,5-12, 15,20,21
A	WO 97 31256 A (BLOK HERMAN ;BARANY GEORGE (US); KEMPE MARIA (US); ZIRVI MONIB (US) 28. August 1997 (1997-08-28) Anspruch 1; Abbildungen 32-34; Beispiele 10-13 ---	1-21
A	WO 99 63385 A (UNIV TEXAS) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) Seite 14, Zeile 6 - Zeile 14; Ansprüche 1,9,10,12 ---	5-7
P,X	WO 01 21326 A (CHUDZIK STEPHEN J ;STUCKE SEAN M (US); SURMODICS INC (US); SWAN DA) 29. März 2001 (2001-03-29) Zusammenfassung Seite 23, Zeile 7 - Zeile 25; Ansprüche 1-33; Beispiele 4,5 -----	1-4, 8-12,15, 20,21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/05173

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0012575	A	09-03-2000	AU	5855699 A	21-03-2000
			WO	0012575 A1	09-03-2000
			EP	1027379 A1	16-08-2000
WO 9731256	A	28-08-1997	AU	735440 B2	05-07-2001
			AU	2799797 A	10-09-1997
			CA	2244891 A1	28-08-1997
			EP	0920440 A2	09-06-1999
			WO	9731256 A2	28-08-1997
WO 9963385	A	09-12-1999	AU	4333799 A	20-12-1999
			WO	9963385 A1	09-12-1999
			US	6295153 B1	25-09-2001
			US	2001010843 A1	02-08-2001
WO 0121326	A	29-03-2001	WO	0121326 A1	29-03-2001
			AU	6249999 A	24-04-2001
			EP	1131167 A1	12-09-2001